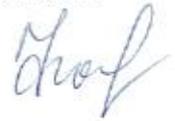


На правах рукописи



ФОКИНА Надежда Александровна

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И
ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Саратов – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Карпунина Лидия Владимировна

Официальные оппоненты: **Коннова Светлана Анатольевна,**
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н.Г.Чернышевского»,
заведующий кафедрой биохимии и биофизики

Четвериков Сергей Павлович,
доктор биологических наук,
Уфимский Институт биологии – обособленное
структурное подразделение Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской
академии наук, заведующий лабораторией
агробиологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет имени И.Т. Трубилина

Защита состоится «__» _____ 2021 года в __00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, УК № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ и на сайте www.sgau.ru

Отзывы направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Среди биополимеров бактериального происхождения особое место занимают экзополисахариды (ЭПС), которые хорошо зарекомендовали себя в различных областях деятельности человека: медицине, ветеринарии, нефтяной, пищевой промышленности, в сельском хозяйстве (Онищенко и др., 2002; Перепелкин, 2005; Ботина, Рожкова, Семенихина, 2010; Сопрунова, Виет Тиен, 2010; Глоба, Гвоздяк, 2015; Сенник, 2015; Широбоков, 2015; Лавина и др., 2016; Ибрагимова, Фомкина, 2016; Пархоменко, 2019). Известно, что полисахариды бактерий обладают реологическими, иммуностимулирующими, ранозаживляющими, пленкообразующими и другими свойствами (Бухарова и др., 2009; Полукаров, 2009; Ботина, Рожкова, Семенихина, 2010; Правдивцева, Карпунина, Бухарова, 2012; Ревин и др., 2018). Экзополисахариды бактерий в отличие от большинства химически созданных полимеров, являются биоразлагаемыми и не вредят экологии (Muhammadi, Ahmed, 2008).

Исходя из этого, изыскание новых продуцентов ЭПС бактериального происхождения является приоритетной задачей в настоящее время.

Степень разработанности темы исследований

Источником получения ЭПС являются многие бактерии (Няникова и др., 2002; Рысмухамбетова и др., 2008; Лахтин и др., 2012; Ксенофонтов и др., 2015; Кичемазова и др., 2017; Boyd, 1995; Garcia - Ochoa, 2000). К бактериям, способным продуцировать ЭПС, относятся и молочнокислые микроорганизмы (Новик, 2002; Ганина, Рожкова, 2005; Абрамова, Семенихина, 2008; Еникеев, 2011; Красникова, Маркелова, 2013; Хохлачева, 2015; Артюхова, Меньших, 2016; Кебекбаева, Молжигитова, Джакибаева, 2017; Kitazawa, 1996; Savadogo et al, 2004; Paulo et al., 2012; Zeidan et al., 2017). Среди них можно выделить бактерии рода *Lactococcus* и *Streptococcus* (Cerning, 1988; Deveau, 2002; Yuksekdag, 2008), представители которых входят в состав нормальной микрофлоры человека и животных (Хавкин, Бельмер, 2003; Макарова, Намазова – Баранова, 2015; Beasley, Saris, 2004), а также входят состав заквасок при производстве кисломолочной и мясной продукции (Рожкова, 2006; Стоянова, 2008; Орлова, Иркитова, 2014; Ханхалаева, Митыпова, 2014; Артюхова, Моторная, 2015; Хохлачева, 2015; Иркитова, 2017). Однако роль этих биополимеров является не до конца изученной. Для обоснования принципа воздействия ЭПС молочнокислых бактерий на живой организм, необходимо иметь более обширные знания об их строении, физико-химических и биологических свойствах (Zeidan et al., 2017).

В связи с этим исследования, посвященные изучению физико-химических и биологических свойств экзополисахаридов молочнокислых бактерий рода *Lactococcus* и *Streptococcus*, являются актуальными и могут иметь значительный научный интерес и прикладное значение.

Цель работы состояла в оптимизации условий культивирования *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus* для обеспечения максимального выхода ЭПС, их выделения, характеристике и перспективах использования.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать условия культивирования (источник углерода, время культивирования) *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, для обеспечения максимального продуцирования ими экзополисахаридов.
2. Выделить и очистить экзополисахариды из бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*.

3. Определить физико-химические свойства (молекулярную массу, химическую природу, углеводный состав, вязкость) экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*.

4. Изучить влияние *in vivo* *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран у экспериментальных животных (крыс).

5. Изучить влияние ЭПС *S. thermophilus* на организм сельскохозяйственной птицы (прирост живой массы птицы и микрофлору) при добавлении в корм.

Научная новизна

Впервые выделены ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, определены их молекулярные массы, химическая природа, моносахаридный состав и вязкость. Показано, что *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* максимально продуцируют экзополисахариды на питательной среде А. Welman с соавт. (2003) с сахарозой в нашей модификации при 27 °С, рН 5,5 на 48 ч культивирования – *L. lactis* В-1662; при 38 °С, рН 5,5 на 48 ч культивирования – *S. thermophilus*. Показано влияние ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран у крыс, в большей степени проявляющееся у ЭПС стрептококка. Обнаружено, что добавление в корм сельскохозяйственной птицы ЭПС *S. thermophilus* способствует увеличению массы тела и количества молочнокислых бактерий.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные результаты вносят значимый вклад в фундаментальные исследования экзополисахаридов бактериального происхождения и открывают перспективы их возможного использования в экспериментальной биологии, ветеринарии и сельском хозяйстве.

По материалам диссертационной работы получен патент на изобретение «Способ выращивания цыплят-бройлеров» (№ 2736967 от 23.11.2020), опубликованы «Методические рекомендации по изучению влияния условий культивирования молочнокислых бактерий на их способность образовывать биоплёнку» (в соавторстве с А.Ю. Тяпкиным, Г.Т. Урядовой, Л.В. Карпуниной, 2019) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, сотрудников микробиологических и биотехнологических лабораторий, рассмотренные и одобренные на заседании кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» (протокол № 16 от 28 апреля 2019 г.); «Методические рекомендации по изучению влияния экзополисахаридов молочнокислых бактерий и пленочных покрытий, созданных на их основе, на заживление ожоговых ранений у лабораторных животных» (в соавторстве с Г.Т. Урядовой, Л.В. Карпуниной, 2020) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, сотрудников микробиологических, биотехнологических и ветеринарных лабораторий, рассмотренные и одобренные на заседании кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» (протокол № 16 от 28 апреля 2020 г.). Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций по микробиологии, биотехнологии, проведении лабораторно-практических занятий и написании дипломных работ в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Методология и методы исследования

Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам выделения и очистки экзополисахаридов, изучению их химического состава, физико-химических и биологических свойств. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследования и изложения материала были

применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимальными условиями культивирования для продукции экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* являются: инкубирование на модифицированной питательной среде А.Welman с соавт. (2003) с сахарозой рН 5,5, время культивирования 48 ч при 27 °С и 38 °С соответственно.

2. Выделенные из культуральной жидкости экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* представлены нейтральной фракцией с молекулярными массами 10 кДа и 20 кДа соответственно. ЭПС *L. lactis* В-1662, состоит из глюкозы, ксилозы в соотношении 1:1 и следовых количеств рамнозы (5,8%); обладает вязкостью 1,3 мм²/с. ЭПС *S. thermophilus*, состоит из рамнозы, галактозы, маннозы в соотношении 1:2:1 с присутствием следов глюкозы (4,4%); обладает вязкостью 1,23 мм²/с.

3. Экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* обладают ранозаживляющим действием при ожогах у крыс, более выраженный эффект проявляет ЭПС *S. thermophilus*.

4. Добавление ЭПС *S. thermophilus* в корм сельскохозяйственной птицы способствует увеличению массы тела и количества молочнокислых бактерий у них.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности результатов обеспечена использованием стандартных биологических, микробиологических, биохимических, физико-химических методов исследований и методов статистической обработки данных.

Материалы диссертации были представлены на: конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы (Саратов, 2011; 2015-2018); IV Всероссийской школе – конференции «Химия и биохимия углеводов» (Саратов, 2011); «Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы» (Саратов, 2014); Всероссийском конкурсе научно-технического творчества молодежи «НТТМ-2015» (Москва, 2015), Ежегодной Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2015); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий» (Саратов, 2016); VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016); Международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии». (Саратов, 2017); 1-м Российском микробиологическом конгрессе (Москва, 2017); IV Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Москва, 2017); 22-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы пищевых и биотехнологий» (Саратов, 2019); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения» (Саратов, 2020); 24-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука

XXI века» (Пушино, 2020); Международной научной конференции PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 работы, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе данных Scopus и 1 патент.

Личный вклад соискателя состоит в подготовке и проведении научных исследований на всех этапах выполнения диссертационной работы, трактовке полученных результатов, оформлении патента и подготовке публикаций, участии в конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, двух глав: обзора литературы и экспериментальной части, включающей объекты и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста и включает 7 таблиц и 15 рисунков. Список литературы включает 230 наименований, в том числе 99 отечественных, 131 зарубежных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты и методы исследований

Объектами исследований явились молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* В-1662, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пушино) и *Streptococcus thermophilus*, полученные из ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (г. Москва).

Для выделения ЭПС, культуры *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* культивировали в жидкой питательной среде А. Welman с соавт. (2003) при встряхивании на шейкере «ES-20» при температуре 27 и 38 °С соответственно.

Наличие белков определяли по методу М. Бредфорд (1976), общее содержание углеводов – фенол-серным методом (Dubois, Cilles, Hamilton, 1956).

Содержание нуклеиновых кислот определяли при 260 нм на спектрофотометре «Cary 100 Scan» (Varian, США) (Остерман, 1985).

Молекулярные массы экзополисахаридов определяли методом гель – хроматографии¹.

Для ЭПС *L. lactis* В-1662 использовали колонку (7,8x300 мм) с гелиевым носителем TSKgel G6000 PWWL. Детекцию проводили на автоматическом анализаторе 2690 AllianceWaters. Колонку калибровали декстранами и глюкозой («Fluka» Швейцария, «Merck» Германия) с молекулярными массами 2000, 110, 10 и 6 кДа.

Для ЭПС *S. thermophilus* использовали колонку с носителем Toyopearl – HW – 50F. ЭПС детектировали на проточном спектрофотометре LKB Bromma 2238 UVICORD SII. В качестве элюента применяли буфер 1 М раствор H₃COOH. Аналитическую колонку калибровали декстранами («Fluka» Швейцария, «Merck» Германия) с известными молекулярными массами (6000, 20000, 180, Да). Скорость элюции составляла 1 мл/мин.

¹ Выражаем глубокую благодарность руководителю НИЛ ООО «ВИК - здоровье животных» к.б.н. Семенову Сергею Вячеславовичу за оказанную помощь в проведении гель-хроматографии.

Для разделения ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на фракции методом ионообменной хроматографии использовали колонку (20x200 мм) с носителем Toyopearl DEAE 650(M) (Tosoh Bioscience, Япония) и СПС Био ДЕАЕ 70 мкм соответственно. Элюирующим раствором являлся буфер (0,04 % NaN_3 , 0,05 М KH_2PO_4 , рН 6,8) и NaCl в том же буфере с градиентом концентрации 1.0.

Моносахаридный состав ЭПС определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для ЭПС *L. lactis* В-1662 ТСХ проводили на пластинке с целлюлозным носителем POLIGRAM® GEL 300 с толщиной слоя 0,1мм, для ЭПС *S. thermophilus* на пластинке с целлюлозным носителем DC- Alufolien Cellulose с толщиной слоя 0,1мм. Элюентом являлся раствор, состоящий из этилацетата, пиридина, уксусной кислоты, воды в соотношении 5:5:1:3. В качестве проявителя использовали анилин фталат (Остерман, 1985; Варбанец, Здоровенко, Книрель, 2006).

ВЭЖХ² проводили на жидкостном хроматографе Smartline 1000 (Knauer, Германия) с детектором Dekade-II (Antec Leiden, Голландия) в режиме пульсамперометрической детекции, на колонке CarboPac 10 (Dionex, США) размером 4x250 мм в 0,0125 М растворе NaOH , скорость потока – 0,7 мл/мин; чувствительность метода – 10-50 нг/мл. Для количественных расчетов использовали метод внешнего стандарта. Предварительно проводили кислотный гидролиз образцов 2-3мг в 1,5 мл 2М трифторуксусной кислоте 3 часа 100 °С. После гидролиза образцы высушивали в токе азота и растворяли в буфере для образцов (0,0125 М раствор NaOH).

Относительную вязкость ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* определяли с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-2 (Россия).

При моделировании ожога у крыс использовали ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, 5% декспантенол в форме крема («Пантодерм», АО «АКРИХИН», Россия). Исследование проводили (в трех повторностях) на белых беспородных крысах-самках массой 270-300 г, прошедших карантин в течение 14 суток. Животные были распределены на 5 групп: 1 группа – без ожога, 2 группа – с ожогом, 3 группа – ожог и коммерческий препарат 5% декспантенол, 4 группа – ожог и 0,6% раствор ЭПС *L. lactis* В-1662, 5 группа – ожог и 0,6% раствор ЭПС *S. thermophilus*. Ожог моделировали под эфирным наркозом на межлопаточном пространстве крысы дном пробирки, наполненной кипящей водой (2/3 объема) (Пономарь, 2012).

Для эксперимента использовали цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15, предоставленных ООО «Возрождение – 1» (с. Идолга, Татищевский район, Саратовская область), которые относятся к мясо-яичному виду бройлерного кросса и характеризуется высокой выживаемостью и быстрым приростом.

Определение массы тела цыплят проводили путем их взвешивания на 22, 25, 28, 31 сутки, 2, 3, 4 и 10 месяц.

Общее микробное число (ОМЧ) и количество молочнокислых бактерий у сельскохозяйственной птицы определяли в течение четырех месяцев методом серийных разведений (Лабинская, 1978), используя для этого питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), лактобакагар и MRS-агар. Эксперимент проводили в трех повторностях.

² Выражаем глубокую благодарность к.б.н., с.н.с. ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) Селиванову Н.Ю. за практическую помощь при определении углеводного состава экзополисахаридов.

Все экспериментальные исследования с животными выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»), требованиями Федерального закона от 01.12.1999 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986 г.).

Статистический анализ результатов проводили по стандартным методикам (Воробьев, Елсуков, 1989). Использовали параметрический t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$. Вычисления проводили с использованием программы StatPlus 2007 Professional 4.9.4.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние условий культивирования на рост и продукцию экзополисахаридов *L. lactis* B-1662

Изучали влияние условий культивирования на среде A.Welman с соавт. (2003) с различным содержанием источников углерода в качестве субстрата (сахароза, лактоза, глюкоза) на рост культур *L. lactis* B-1662 и выход ЭПС.

Известно, что выбор источника углерода оказывает большое влияние на биосинтез экзополисахаридов молочнокислыми бактериями. Основными источниками углерода для молочнокислых бактерий являются глюкоза, галактоза, лактоза, манноза, фруктоза и сахароза, а также комбинации из этих сахаров (Gamarnourani, Blondeau, Simonet, 1997; Yuksekdag, Aslim, 2008).

Было показано (Таблица 1), что при культивировании лактококка на среде с лактозой выход ЭПС составлял 467 мг/л. При внесении в среду культивирования глюкозы продукция ЭПС повышалась и составляла 687 мг/л. При добавлении же сахарозы в среду культивирования продукция ЭПС увеличивалась до 753 мг/л.

Таблица 1 – Влияние различных источников углерода на продукцию ЭПС *L. lactis* B-1662

Углеводы	Продукция ЭПС, мг/л
Лактоза	467,0±4,0
Глюкоза	687,0±5,1
Сахароза	753,0±6,5

Полученные данные хорошо коррелировали с данными других исследователей, в которых наилучший выход наблюдался на среде с сахарозой (Рысмухамбетова и др., 2008; Карташев, Коев, 2016).

В литературе встречаются сведения о том, что продукция ЭПС у некоторых молочнокислых бактерий совпадает с ростом самой культуры (Deveau, Van Calsteren, Moineau, 2002). Для определения времени максимального выхода ЭПС была построена кривая роста бактерий (Рисунок 1). Как видно из рисунка, бактерии *L. lactis*

В-1662 выходили на фазу стационарного роста через 12 ч после начала культивирования, которая длилась в среднем 20 ч. Через 48 – 50 ч происходило угнетение роста бактерий.

Параллельно с ростом данной культуры в процессе культивирования определяли выход ЭПС, количество которого измеряли фенол-серным методом. Выход ЭПС начинался с 12 ч и достигал своего максимума к 24–26 ч (Рисунок 1).

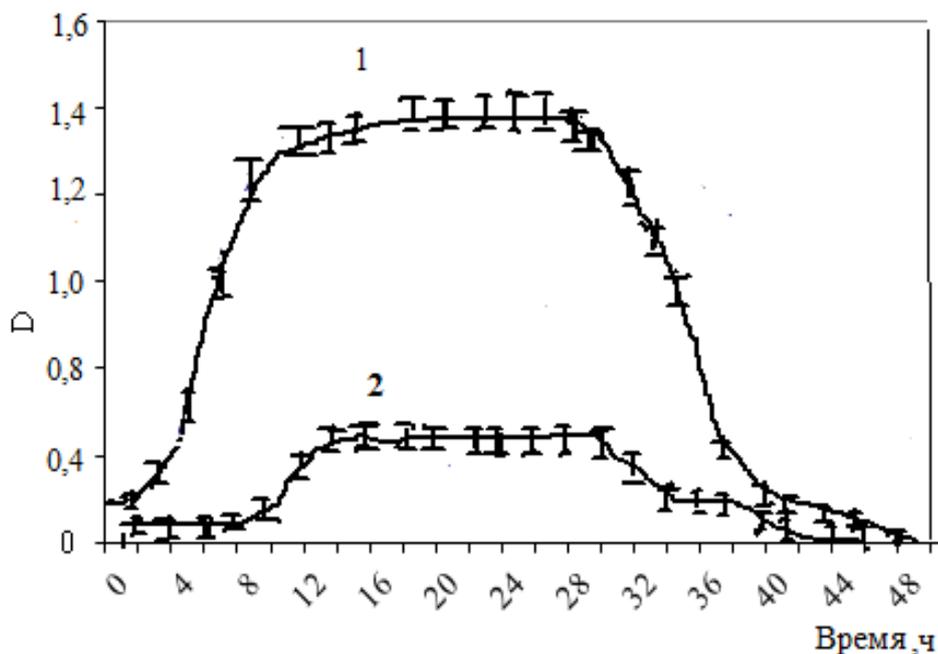


Рисунок 1 – Кривая роста (1) и продукция ЭПС (2) *L. lactis* В-1662

Влияние условий культивирования на рост и продукцию экзополисахаридов *S. thermophilus*

При выращивании стрептококка на среде A.Welman с соавт. (2003) с разными источниками углерода было показано (Таблица 2), что на среде с глюкозой выход ЭПС составлял 1,5 г/л. При внесении в среду культивирования лактозы продукция ЭПС была равна 1,7 г/л, при добавлении сахарозы – 2,3 г/л. То есть добавление сахарозы в среду культивирования способствовало увеличению продукция ЭПС, как и в случае с лактококком.

Таблица 2 – Влияние различных источников углеродов на продукцию ЭПС *S. thermophilus*

Углеводы	Продукция ЭПС, г/л
Глюкоза	1,5±0,4
Лактоза	1,7±0,2
Сахароза	2,3±0,2

Для изучения влияния времени культивирования на продукцию ЭПС строили кривую роста *S. thermophilus* (Рисунок 2) при выращивании бактерий на среде с сахарозой и определяли выход ЭПС. Было показано, что максимальный рост

культуры стрептококка совпадал с максимальной продукцией ЭПС и приходился на стационарную фазу роста (16 -24 часа).

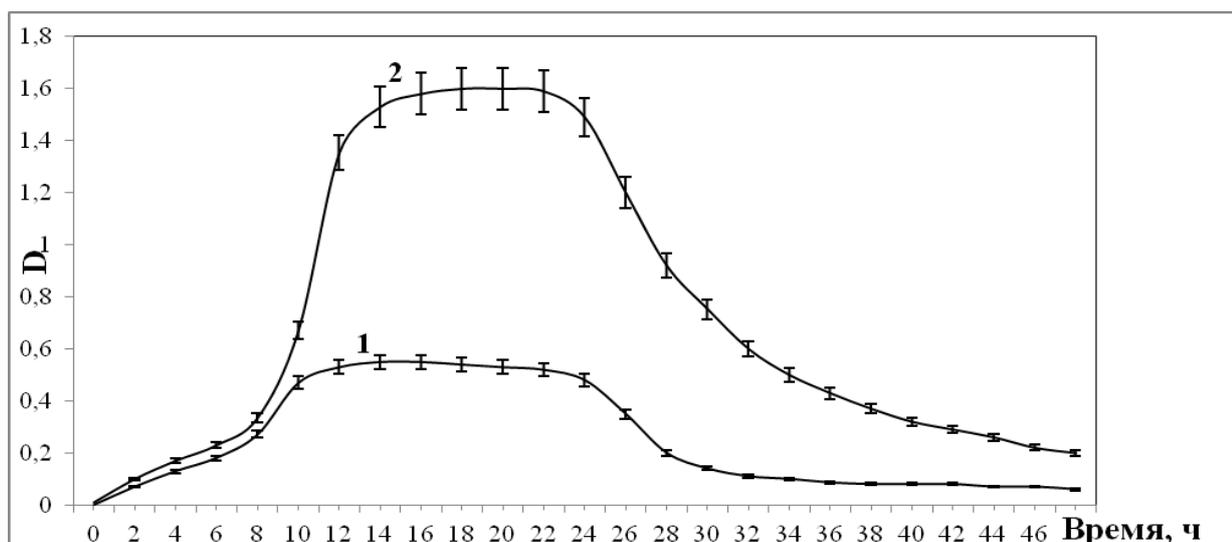


Рисунок 2 – Кривая роста (1) и продукция ЭПС (2) *S. thermophilus*

Выделение и очистка экзополисахаридов *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus*

Выделение ЭПС проводили по методу J. Cerning с соавт. (1988) в нашей модификации. Для выделения ЭПС *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* бактерии выращивали на среде A. Welman с соавт. (2003) в течение 48 часов, затем культуральную жидкость центрифугировали при 3000g в течение 30 мин. Осадок биомассы удаляли, а надосадочную жидкость упаривали на роторном испарителе N-1100VWD (Япония). Отсутствие бактерий на данном этапе контролировали путем микроскопирования препаратов, окрашенных методом Грама. Затем ЭПС осаждали двойным объемом 96%-го этилового спирта. Полученный концентрат растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, далее центрифугировали при 3000g в течение 30 минут и осаждали двойным объемом 96%-го этилового спирта. Процедуру центрифугирования и переосаждения повторяли еще 2 раза. Дальнейшую очистку проводили методом гель-фильтрации, используя колонку с носителем Sephadex G-10 для ЭПС *L. lactis* B-1662 и Sephadex G-50 (элюент 1M CH₃COOH, pH 5,5) для ЭПС *S. thermophilus*. Выделенные ЭПС высушивали до состояния порошка на лиофильной сушке COOLSAF 55-4 SISTEM (ScanLaf, Дания). Полученные после выделения и очистки ЭПС *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* представляли собой порошки светло-коричневого цвета, без запаха, не имеющие в своем составе белок, нуклеиновые кислоты и клетки бактерий.

Физико-химические свойства экзополисахарида *L. lactis* B-1662

Молекулярная масса *L. lactis* B-1662, определяемая методом гель-хроматографии, составила 10 кДа (Рисунок 3, Таблица 3).

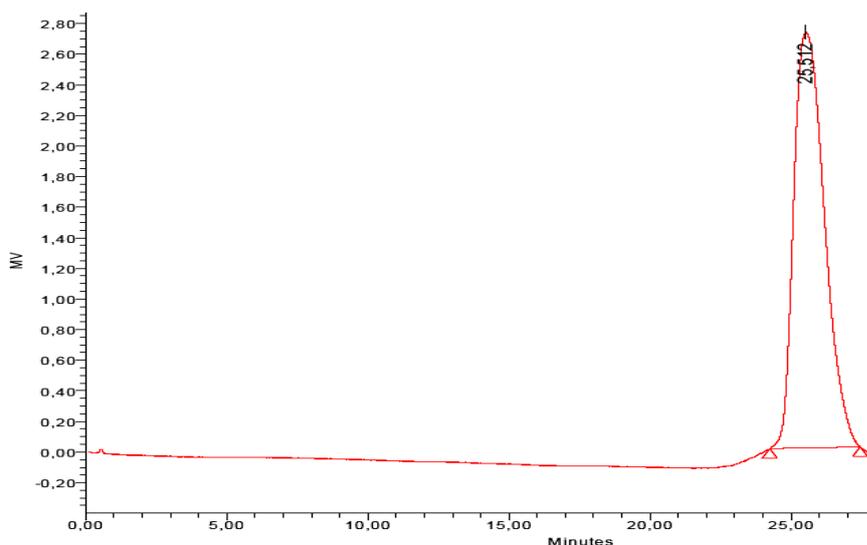


Рисунок 3 – Хроматограмма определения молекулярной массы ЭПС. полученного из *L lactis* B-1662 на сахарозе на колонке с TSKgelG6000 PWXL

Таблица 3 – Определение молекулярной массы ЭПС *L. lactis* B-1662 на колонке TSK gel тип G 6000 PWXL

Образец	Время выхода максимального пика, мин	Молекулярная масса, кДа
Декстран	21,73	2000
Декстран	23,20	110
Декстран	24,60	10
Глюкоза	25,76	6
ЭПС <i>L. lactis</i> B-1662	25,51	10

По данным ионообменной хроматографии ЭПС *L. lactis* B-1662 состоял из одной фракции соответствующей нейтральному веществу (Рисунок 4).

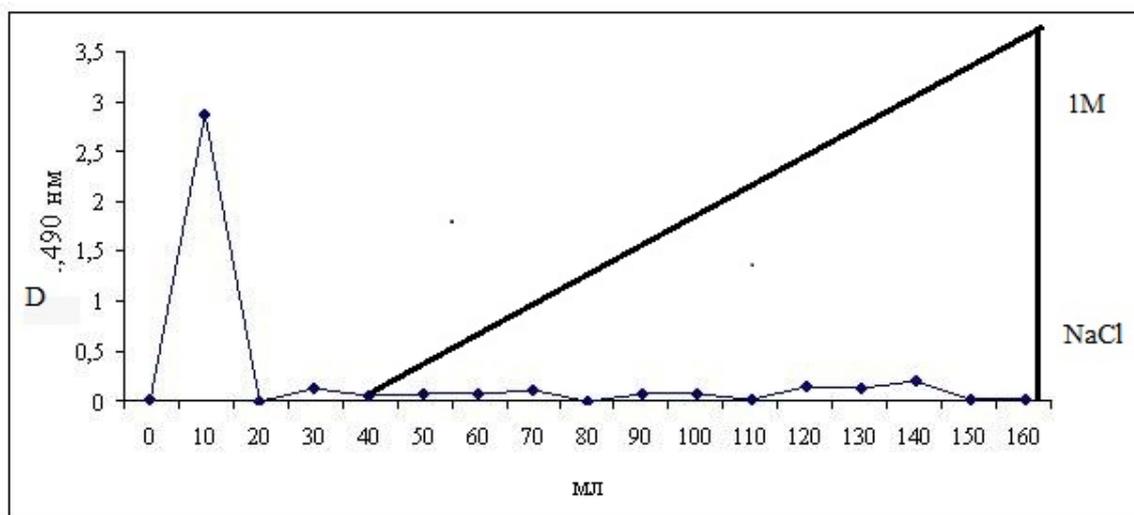


Рисунок 4 – Профиль элюции ЭПС *L. lactis* B-1662 при ионообменной (детекция по углеводам) хроматографии на колонке DEAE-C Toyopearl 650M

Определение моносахаридного состава методом ТСХ показало, что в состав ЭПС *S. thermophilus* входят глюкоза и ксилоза. Методом ВЭЖХ были обнаружены глюкоза, ксилоза в соотношении 1:1, а также следовые количества рамнозы – 5, 8% (Рисунок 5).

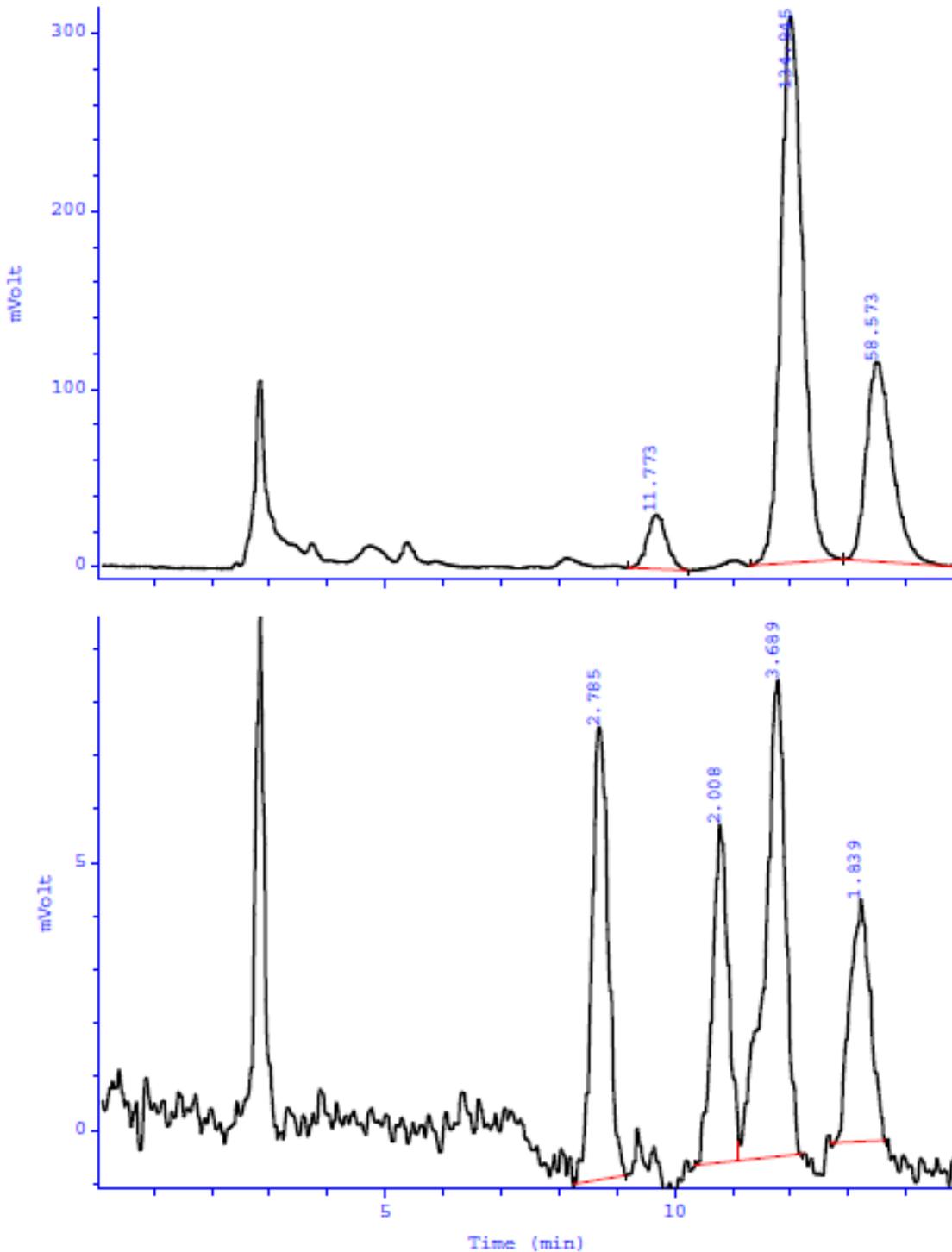


Рисунок 5 – Высокоэффективная жидкостная хроматография ЭПС *L. lactis* В-1662

Относительная вязкость, которую определяли с помощью капиллярного вискозиметра, составила $1,3 \text{ мм}^2/\text{с}$.

Физико-химические свойства экзополисахарида *S. thermophilus*

Молекулярная масса ЭПС *S. thermophilus*, определяемая методом гель-хроматографии, составила 20 кДа.

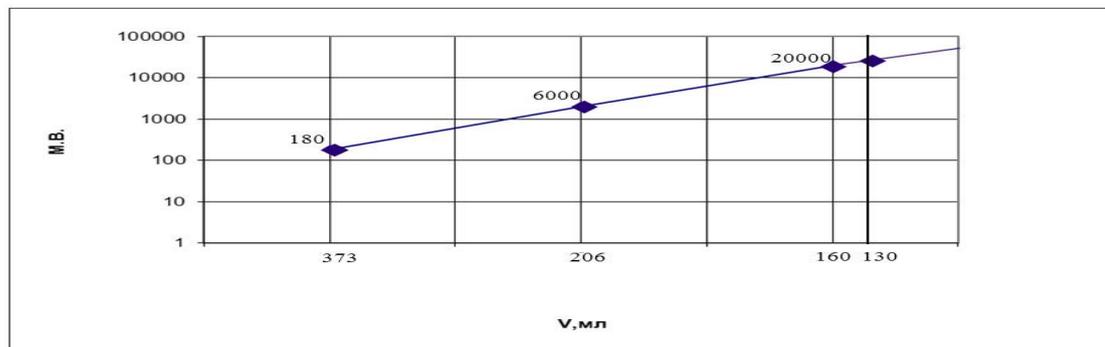


Рисунок 6 – Хроматограмма определения молекулярной массы ЭПС, полученного из *S. thermophilus* на колонке Тоуорpearl – HW-50F

По результатам ионообменной хроматографии ЭПС *S. thermophilus* состоял только из нейтральной фракции (Рисунок 7).

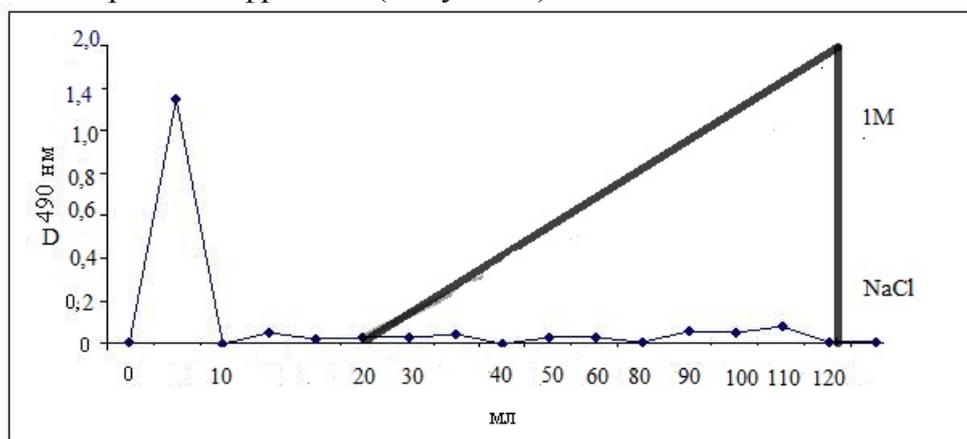


Рисунок 7 – Профиль элюции ЭПС *S. thermophilus* при ионообменной (детекция по углеводам) хроматографии на колонке СПС Био ДЕАЕ 70

Определение моносахаридного состава методом ТСХ показало, что в состав ЭПС *S. thermophilus* входят глюкоза и рамноза. Методом ВЭЖХ были обнаружены рамноза, галактоза, манноза в соотношении 1:2:1, а также следовые количества глюкозы – 4, 4% (Рисунок 8).

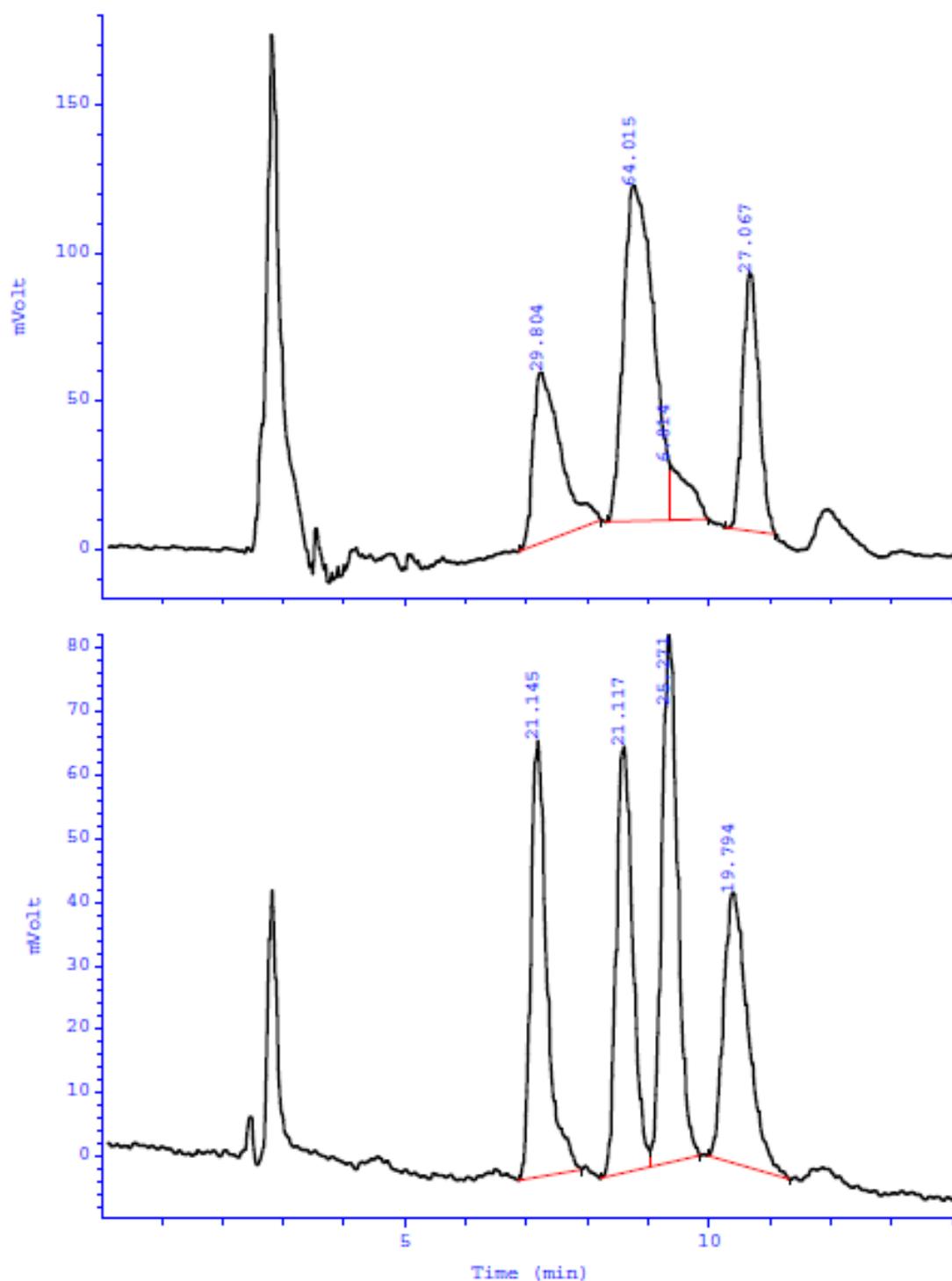


Рисунок 8 – Высокоэффективная жидкостная хроматография нейтральной фракции ЭПС *S. thermophilus*

Относительная вязкость была определена с помощью капиллярного вискозиметра и составила $1,23 \text{ мм}^2/\text{с}$.

Изучение влияния экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ран при моделировании ожогов у крыс

Изучение влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожогов проводили на лабораторных животных (крысах). Животные были разделены на контрольные (без ожога, с ожогом, с 5% декспантенолом) и опытные (ожог и 0,6% раствор ЭПС *L. lactis* В-1662, ожог и 0,6% раствор ЭПС *S. thermophilus*) группы. За сутки до эксперимента крысы были продепилированы путем выщипывания обозначенной для ожога поверхности. Ожог моделировали под эфирным наркозом на межлопаточном пространстве крысы дном пробирки, наполненной кипящей водой (2/3 объема) в течение 30 секунд для формирования ожога степени IIIa. Нанесение 5% декспантенола («Пантодерм», АО «АКРИХИН», Россия) и бактериальных ЭПС проводили сразу же после нанесения ожога и далее ежедневно в течение 28 суток эксперимента. О процессе заживления ожога судили по размерам площади ожога и застанию ран, которое проводили на 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 и 28 сутки.

В процессе исследований было показано, что заживление в группах животных существенно отличались (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на ожоги у крыс

Время, сутки	Группы животных			
	2	3	4	5
	ожог	ожог +5 % декспантенол	ожог + ЭПС <i>L. lactis</i> В-1662	ожог + ЭПС <i>S. thermophilus</i>
	Площадь ожога, см ²			
1	2,80±0,10	2,40±0,20	2,20±0,10*	1,50±0,20*
3	3,00±0,30	3,00±0,20	1,50±0,22*	1,50±0,20*
5	2,40±0,20	2,60±0,30	1,50±0,20*	1,20±0,30*
7	2,10±0,22	2,50±0,21	1,25±0,08*	1,10±0,30*
10	0,50±0,12	2,00±0,14*	1,20±0,13*	1,10±0,12*
14	0,40±0,12	0,20±0,08	0,20±0,05	0,20±0,01
21	0,10±0,05	0,08±0,002	0,02±0,005	0,02±0,005
23	0,10±0,05	0,10±0,05	-	-
25	0,10±0,05	-	-	-
28	-	-	-	-

Примечание – $P \leq 0,05$ *относительно 2 группы.

Во 2 группе животных у которых вызывали ожог, через 1 сутки образовывалась небольшая сухая корка темно-красного цвета с ровными краями. Цвет и форма корки (струпа) оставались неизменными в течение всего эксперимента, отслоения струпа не происходило. На 7 сутки отмечали прорастание шерсти на месте ожога. Через 10 суток наблюдали сокращение площади корки. Полное заживление ожога и восстановление шерстного покрова у крыс этой группы происходило через 28 суток.

При нанесении 5% декспантенола животным (группа 3) наблюдали идентичную картину, как у животных в группе 2. Также через сутки образовывалась корка темно-красного цвета с ровными краями, площадь которой начинала уменьшаться с 14 суток. Отшелушивания корки на протяжении всего эксперимента не происходило. Прорастание шерсти также наблюдали на 7 сутки. Однако заживление раны

происходило к 25 суткам, как видно из таблицы 4, а шерстный покров полностью восстанавливался к 28 суткам эксперимента.

При нанесении на ожоговую рану животным ЭПС *L. lactis* В-1662 (группа 4) через 1 сутки также наблюдали образование корки красного цвета с ровными краями. Начиная уже с 1 суток, происходило уменьшение площади ожога по сравнению с контролем (Таблица 4). На 5 сутки было замечено прорастание шерсти на поверхности ожога. На 7 сутки наблюдали отшелушивание корки, а на 10 сутки и её отслоение. На 23 сутки наблюдали полное заживление и зарастание шерстью ожоговых ран.

При нанесении ЭПС *S. thermophilus* животным (группа 5) также через сутки наблюдали уменьшение площади раны. Однако, как видно из таблицы 4, площадь раны у крыс была значительно меньше, чем у животных 4 группы, раны которых обрабатывали ЭПС *L. lactis* В-1662. На 5 сутки начиналось более интенсивное прорастание шерсти у крыс по сравнению с животными 4 группы. Слушивание и отслоение корки наблюдали в то же время, что и у животных 4 группы на 7 сутки. Заживление раны и полное восстановление шерстного покрова наблюдали также на 23 сутки, как и в случае обработки ран у крыс ЭПС *L. lactis* В-1662 (4 группа). Однако было замечено, что в случае обработки ран у крыс ЭПС *S. thermophilus* шерстный покров визуально был более густой и равномерный, чем у крыс, раны которых обрабатывали ЭПС *L. lactis* В-1662.

Изучение влияния экзополисахарида *S. thermophilus* на организм сельскохозяйственной птицы

Изучение влияния ЭПС *S. thermophilus* проводили в период с июля 2014 г. по июнь 2015 г. Исследуемые цыплята кросса Хаббард ИЗА Ф-15 яичного направления были распределены на контрольную и опытную группы. В контроле цыплята получали основной рацион кормления. В опытной же группе, помимо основного рациона, цыплята получали перорально по 10 мл раствора ЭПС *S. thermophilus* (0,06 г/кг массы птицы) два раза в неделю в течение первого месяца жизни. Для формирования групп подбирали здоровых цыплят, выровненных по живой массе и развитию, характерному для суточного возраста. Условия содержания, показатели микроклимата, кучность посадки во всех группах были одинаковыми. Содержание цыплят было напольным, на глубокой подстилке из древесной стружки. Во время эксперимента антибиотики не применялись.

При проведении исследований у цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15 была изучена в динамике живая масса. Живую массу цыплят изучали путем индивидуального взвешивания в одно и то же время, до утреннего кормления. Динамика живой массы подопытных цыплят представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Влияние ЭПС *S. thermophilus* на прирост живой массы сельскохозяйственной птицы кросса Хаббард ИЗА Ф-15 (M±m), грамм

Группа	Сутки				Месяцы			
	22	25	28	31	2	3	4	10
Опытная	625,2 ± 11,17*	706,0 ± 11,47*	689,0 ± 10,80*	700,0 ± 6,8*	1041,0 ± 30,12*	1508,0 ± 28,8	1735,0 ± 50,12	3442,0 ± 50,0
Контрольная	564,0 ± 18,04	649,0 ± 15,2	636,0 ± 14,19	645,0 ± 9,08	962,0 ± 21,07	1462,0 ± 36,0	1664,0 ± 44,0	3328,0 ± 100,3

Примечание – * различия достоверны (P ≤ 0,05) относительно контроля.

При выводе цыплят их живая масса составила 40 г. Дальнейший прирост живой массы в обеих группах (контрольной и опытной) проходил практически равномерно и составлял через 1 сутки – 55-56 г, через 21 сутки – 539-545 г. Разница в массе птицы контрольных и опытных групп начинала происходить через 22 суток. Как видно из таблицы 5, в опытной группе цыплят, где в корм был добавлен ЭПС *S. thermophilus*, масса тела птицы составила 625,2 г, что на 10,9 % уже превосходило массу тела цыплят в контрольной группе. Разница в массе птицы опытной и контрольной групп наблюдалась на протяжении 2 месяцев. К концу 2 месяца (60 дней) в опытной группе цыплят масса тела была равна 1041г, что было выше контроля на 8,2% (Таблица 5). В последующие месяцы разницы в массе цыплят опытных и контрольной групп не наблюдалось.

При определении микробиологических показателей было показано (Таблица 6), что на второй месяц жизнедеятельности у цыплят опытной группы снизилось ОМЧ на 50 % (по сравнению с контролем, а количество молочнокислых бактерий увеличилось на 33,3 %. На третий месяц опыта отмечено аналогичное снижение ОМЧ, а количество молочнокислых бактерий было больше на 75,0 %. На 4 месяц опыта по показателю ОМЧ разницы не было обнаружено.

Таблица 6 – Влияние ЭПС *S. thermophilus* на микрофлору сельскохозяйственной птицы, КОЕ/г

Группа	Месяц опыта							
	1		2		3		4	
	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий
Опытная	$1,0 \times 10^{10} \pm 0,9^*$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,4^*$	$1,0 \times 10^9 \pm 0,2^*$	$4,0 \times 10^9 \pm 0,2^*$	$1,0 \times 10^{11} \pm 0,2^*$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,5^*$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,01$	$3,0 \times 10^7 \pm 0,4^*$
Контрольная	$5,0 \times 10^9 \pm 0,9$	$5,0 \times 10^8 \pm 0,4$	$2,0 \times 10^9 \pm 0,2$	$3,0 \times 10^9 \pm 0,2$	$2,0 \times 10^{11} \pm 0,2$	$4,0 \times 10^8 \pm 0,5$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,01$	$7,0 \times 10^6 \pm 0,4$

Примечание – * различия достоверны ($P \leq 0,05$) относительно контроля.

Анализируя полученные данные, можно говорить о том, что введение в корм цыплятам кросса Хаббард ИЗА Ф-15 ЭПС *S. thermophilus* способствует увеличению их массы тела на первых этапах их жизнедеятельности на протяжении двух месяцев, на общем фоне увеличения количества молочнокислых бактерий и снижения ОМЧ.

Заключение

В результате проведенных исследований были выделены и охарактеризованы ЭПС *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus*. Было показано, что значительное влияние на продукцию оказывают различные источники углерода в составе питательной среды. Оптимальными условиями для продукции ЭПС *L. lactis* В – 1662 являлись: среда А. Welman с соавт. (2003), 27 °С, встряхивание 180 об/мин; для *S. thermophilus* – среда А. Welman с соавт. (2003), 38 °С, встряхивание 180 об/мин. Экзополисахарид *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* состоят только из нейтральной фракции с молекулярными массами 10 кДа и 20 кДа соответственно. В составе нейтральной фракции ЭПС *L. lactis* В – 1662 имеется глюкоза, ксилоза, следовые количества рамнозы, а *S. thermophilus* – рамноза, галактоза и манноза, следы глюкозы. Относительная вязкость 10% раствора ЭПС *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* составляет 1,3 мм²/с и 1,23 мм²/с соответственно. Изучено влияние ЭПС на заживление ожоговых ран у лабораторных животных (крыс). Оба ЭПС обладали ранозаживляющими свойствами с преимуществом ЭПС *S. thermophilus*. Выявлено, что ЭПС *S. thermophilus* оказывает влияние на организм сельскохозяйственной птицы, увеличивая массу тела и количество молочнокислых бактерий. Полученные результаты по изучению свойств экзополисахаридов *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* открывают перспективы их применения в медико-биологической практике, сельском хозяйстве.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Положительное влияние ЭПС молочнокислых бактерий *L. Lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран животных и организм сельскохозяйственной птицы, установленное в настоящей работе, может являться основой в перспективе для их применения в сельском хозяйстве.

Выводы

1. Подобраны оптимальные условия для максимального выхода ЭПС из клеток *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* культивирования: среда А. Welman с соавт. (2003) в нашей модификации, рН 5,5, время культивирования 48 ч, температура 27 °С и 38 °С соответственно.
2. Впервые выделены экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, представленные нейтральной фракцией с молекулярными массами 10 кДа и 20 кДа соответственно. ЭПС *L. lactis* В-1662, состоит из глюкозы, ксилозы в соотношении 1:1 и следовых количеств рамнозы (5,8%); обладает вязкостью 1,3 мм²/с. ЭПС *S. thermophilus*, состоит из рамнозы, галактозы, маннозы в соотношении 1:2:1 с присутствием следов глюкозы (4,4%); обладает вязкостью 1,23 мм²/с.
3. Показано, что ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* способствуют заживлению ожогов степени IIIа у крыс с полным восстановлением кожно-шерстного покрова. Наилучший регенерирующий эффект выявлен в отношении ЭПС *S. thermophilus*.
4. Установлено, что введение в корм цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15 ЭПС *S. thermophilus* способствует увеличению их живой массы до 2-х месячного возраста.
5. Обнаружено, что введение в рацион цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15 ЭПС *S. thermophilus* повышает количество молочнокислых бактерий через 1 месяц в 1,4 раза, а через 4 месяца – в 4,2 раза по сравнению с контролем.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. Фокина, Н.А. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 12. – С. 40 – 42.
2. Фокина Н.А. Физико-химические свойства экзополисахарида *Lactococcus lactis* / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Известия Самарского Научного Центра Российской Академии Наук. – 2017. – № 2 (19). – С. 174 – 177.
3. Фокина, Н.А. Влияние условий культивирования на продукцию экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Изв. Сарат. ун-та. Нов.сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, вып. 2. – С. 179 – 181.

В издании из международной базы данных

4. Fokina, N.A. Physical and chemical properties of exopolysaccharide of the lactic streptococcus / N.A. Fokina, G.T. Uryadova, L.V. Karpunina, S.V. Savina, V.M. Skorlyakov // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – V. 723, N 3. – P. 1 – 6.

Патенты

5. Патент 2736967 Российская Федерация, Способ выращивания цыплят-бройлеров / Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В., заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». – № 2020110105; заявл. 11.03.2020; опубл. 23.11.2020; Бюл. № 33 – 7 с.

Публикации в материалах конференций и других изданиях

6. Невесенко (Фокина), Н.А. Выделение ЭПС *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования / Н.А. Невесенко, Л.В. Карпунина, Д.А. Жемеричкин // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 10. – С. 74.
7. Фокина, Н.А. Влияние условий культивирования на продукцию экзополисахаридов лактококков / Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – №4. – С. 49 – 50.
8. Фокина, Н.А. Некоторые физико-химические свойства экзополисахарида *Lactococcus lactis* / Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Химия и биохимия углеводов: материалы IV Всероссийской школы-конференции, 14-16 сентября 2011. – Саратов, 2011. – С. 80.
9. Фокина, Н.А. Экзополисахарид *Lactococcus lactis*: условия выделения и свойства / Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Биотехнология: реальность и перспективы: материалы Международной научно-практической конференции, 1-3 декабря 2014. – Саратов, 2014. – С. 209.
10. Урядова, Г.Т. Выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Саратов, 2015. – С. 109 – 113.
11. Фокина, Н.А. Экзополисахарид *Streptococcus thermophilus*: условия выделения и свойства / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин, С.Ш. Нурмамбетова, Л.В. Карпунина // Актуальная биотехнология. – 2015. – №3 (14). – С. 41 – 42.

12. Фокина, Н.А. Характеристика экзополисахарида молочнокислого стрептококка / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: материалы VIII Всероссийской конференции молодых ученых 26-30 сентября 2016 г. – Саратов, 2016. – С. 127.
13. Урядова, Г.Т. Экзополисахариды молочнокислых бактерий их возможное применение / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, ИЦ «Наука», 2017. – С. 209 – 211.
14. Урядова, Г.Т. Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их свойства / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина // 1-й Российский Микробиологический Конгресс. – Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 131.
15. Фокина, Н.А. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на заживление ожогов у крыс / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.Н. Шорина, Л.В. Карпунина // Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пущино, 2018. – С. 319.
16. Фокина, Н.А. Действие экзополисахаридов молочнокислых бактерий на процесс заживления ожогов у крыс / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин, Л.Н. Шорина, Л.В. Карпунина // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2018. – № 4. – С. 117 – 124.
17. Фокина, Н.А. Перспективы использования экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы пищевых и биотехнологии: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2019. – С. 163.
18. Фокина, Н.А. Влияние бактериального экзополисахарида на морфологические и микробиологические показатели у птицы / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Таврический вестник аграрной науки. – 2019. – № 4(20). – С. 117– 123.
19. Фокина, Н.А. Состав экзополисахаридов молочнокислых бактерий / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Биология – наука XXI века: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пущино, 2020. – С. 365.
20. Урядова, Г.Т. Функциональная значимость экзополисахаридов молочнокислых бактерий в организме животных / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина Л.В. Карпунина // Зыкинские чтения: материалы национальной научно-практической конференции посвященной памяти д.м.н., профессора Л.Ф. Зыкина / под редакцией О.С. Ларионовой, И.А. Сазоновой. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2020. – С. 206.
21. Фокина Н.А. Экзополисахариды молочнокислых бактерий: прикладные аспекты / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина // Вторая Международная научная конференция PLAMIC 2020. «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» – Саратов, 2020. – С. 75.
22. Фокина, Н.А. Экзополисахариды молочнокислых бактерий в заживлении ожоговых ран у крыс / Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Н.Ю. Селиванов, Л.В. Карпунина // Аграрные конференции. – 2021. – № 3 (27). – С. 26 – 32.